

Development and Validation of Microfluidic Lab-  
on-chip Analyzers for the *In Situ* Quantification  
of Dissolved Iron and Manganese Species in  
Seawater

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES

DER MATHEMATISCH - NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT

DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

VORGELEGT VON

FELIX GEIßLER

Kiel, August 2019

1. Gutachter: Prof. Eric P. Achterberg

2. Gutachter: Dr. Ralf Prien

Datum der Disputation: 15.11.2019

## Summary

There has been an increasing demand over the last decades for autonomous *in situ* measurement systems for the quantification of physical and chemical parameters in the marine environment. The demand is largely linked to the need to address the present undersampling of the world's oceans. The need for reliable and well resolved time series, both on a temporal and spatial scale, cannot be satisfied with conventional approaches involving collection of discrete samples during ship campaigns followed by their analysis in a land-based laboratory. The high demand for autonomous *in situ* measurements is also linked to the associated extensive logistical efforts and the risk of compromising the integrity of the samples during manual sample collection, and thus limiting the investigation of highly dynamic biogeochemical processes.

Of particular interest is the acquisition of time series for dissolved trace metals such as iron (Fe) and manganese (Mn) in marine waters. Those trace metals are essential micronutrients for marine organisms. Iron and Mn regulate cell functions such as photosynthesis and their bioavailability affects therefore the growth and composition of phytoplankton communities, representing the world's largest sink for atmospheric carbon dioxide. Thus, well resolved data of Fe and Mn distributions and fluxes will help to better understand micronutrient cycling, associated biological responses and marine ecosystem dynamics as a response to episodic events. Well resolved micronutrient time series can further improve parameterization of biogeochemical models, allowing us to project feedbacks to climate changes. However, the determination of Fe and Mn in a complex matrix such as seawater is challenging as these elements can be present at very low concentrations in open ocean regions (down to  $10^{-12}$  mol·L<sup>-1</sup>) and exhibit complex speciation chemistry.

This PhD project investigates whether the well-established spectrophotometric approaches for Fe and Mn using Ferrozine (FZ) and 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN) as complexing agents, respectively, can be utilized for reliable and accurate *in situ* quantification of dissolved Fe (DFe) and Mn (DMn) species in an autonomous wet chemical analyzer based on lab-on-chip (LoC) technology. Those systems are based around a microfluidic chip and integrate all steps of analysis (sampling, sample treatment, chemical reaction, detection, data processing) into a single instrument. Their small physical size, portability as well as low power and reagent consumption is key for envisaged autonomous long-term deployments.

The following main findings were obtained:

- Laboratory based characterization of the performance of the LoC analyzer systems showed linear detection regimes ranging from the respective detection limits, 1.9 nM for DFe and 27.1 nM for DMn, to several  $\mu$ M of the respective trace metal. This range enables determinations in marine environments where elevated DFe and DMn concentrations are present, such as regions near trace metal sources, e.g. coastal and estuarine systems, hydrothermal vents or regions characterized by extensive dust deposition. However, for deployments in open ocean regions, detection limits down to 0.1 nM are required. Thus, further research has to be undertaken in order to quantify distributions *in situ* in oceanic regions characterized by trace metal depletion.
- It was found that the design of the LoC analyzer for the detection of DFe needed to be re-worked in order to allow on-line acidification of the water sample prior to the addition of the FZ reagent. This was necessary as a 16 % to 75 % underestimation of *in situ* determined DFe concentrations compared to those obtained from analysis via inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) of discretely collected samples during a test campaign conducted in the Kiel fjord (Germany) was observed using the first design version. Laboratory based acidification experiments with a natural water sample showed full recovery of spectrophotometrically determined DFe concentrations when the sample was acidified to pH  $\sim$  1 prior to the addition of FZ reagent in order to liberate all Fe from its natural organic complexes and make it therefore accessible to FZ. However, Fe contamination originated from acid induced Fe leaching from the analyzers materials were observed during a second test deployment.
- The composition of the PAN reagent for DMn determination was successfully adapted for the use in a microfluidic manifold for long-term deployments. The stability of the PAN reagent could be enhanced by adaptation of the used surfactant volume. A siderophore type Fe masking agent, which was supposed to suppress any Fe interference with the PAN method, showed limited life time and also removed Mn from the PAN accessible pool resulting in an underestimation of Mn concentrations.

- A test deployment in the Kiel fjord was successfully conducted with a DMn LoC analyzer. The processed *in situ* DMn concentrations were in good agreement with those of discrete samples analysed via ICP-MS. An accuracy of > 99 % was obtained for certain periods.

Overall, the here presented work demonstrates that the spectrophotometric determination of DMn species on a system based around a microfluidic chip is a powerful tool for the acquisition of reliable and temporally well resolved *in situ* DMn time series in coastal waters. The *in situ* quantification of DFe species needs further improvements, but in its current state it represents a useful technique for recording relative changes of DFe concentrations in seawater.

This PhD project contributes to the vastly needed development of autonomous *in situ* observing platforms for trace metals in marine waters. It can help to better understand fundamental biogeochemical processes linked to the distribution of dissolved trace metals. Furthermore, data from further deployments can be used to calculate trace metal fluxes, fill gaps in databases and provide a baseline for predictions of consequences of climate driven change.

## Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten ist die Nachfrage nach autonomen *In-situ*-Messsystemen zur Quantifizierung physikalischer und chemischer Parameter in marinen Gewässern drastisch gestiegen. Die hohe Nachfrage ist weitestgehend damit verbunden, der derzeitigen Unterprobung der Weltozeane entgegenzuwirken. Der Bedarf an zuverlässigen und zeitlich sowie räumlich gut aufgelösten Zeitserien kann mit den konventionellen Methoden der manuellen Probennahme während Schiffsausfahrten und deren Analyse in landgestützten Laboratorien nicht erfüllt werden. Des Weiteren birgt die konventionelle Probennahme und -analyse ein erhebliches Risiko bezüglich der Integrität der Proben und ist mit übermäßigem logistischem Aufwand verbunden. Daher ist eine genaue Untersuchung von hochdynamischen biogeochemischen Prozessen stark eingeschränkt.

Von besonderem Interesse ist die *In-situ*-Erfassung von Zeitserien für Spurenmetalle wie Eisen (Fe) und Mangan (Mn) im Meerwasser. Diese Spurenmetalle stellen essentielle Mikronährstoffe für Meeresorganismen dar. So regulieren Fe und Mn wichtige Zellfunktionen wie die Photosynthese und beeinflussen daher durch ihre Bioverfügbarkeit das Wachstum und die Zusammensetzung ganzer Phytoplanktongemeinschaften, eine der weltweit größten Kohlendioxidsenken. Somit können gut aufgelöste Daten der Verteilung und Flüsse von gelöstem Fe (DFe) und Mn (DMn) dazu beitragen, Kreisläufe von Mikronährstoffen und die damit verbundenen biologischen Feedbacks sowie die Dynamik des marinen Ökosystems als Reaktion auf episodische Ereignisse besser zu verstehen. Verlässliche Zeitreihen von Mikronährstoffen guter Auflösung können die Parametrisierung biogeochemischer Modelle weiter verbessern, sodass Rückkopplungen auf den Klimawandel projiziert werden können. Jedoch ist die Bestimmung von Fe und Mn in einer so komplexen Matrix wie Meerwasser mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Die Spurenmetalle liegen in sehr geringen Konzentrationen in Regionen des offenen Ozeans (bis zu  $10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) sowie in einer Vielzahl von unterschiedlichen Spezies vor.

Die vorliegende Dissertation untersucht, inwiefern die etablierten spektrophotometrischen Verfahren zur Bestimmung von Fe und Mn mit den Komplexbildnern Ferrozin (FZ) und 1-(2-Pyridylazo)-2-naphthol (PAN) eingesetzt werden können, um zuverlässige und präzise *In-situ*-Messungen von im Meerwasser befindlichem DFe und DMn mittels eines

autonomen nass-chemischen Analysators auf Basis der ‚Lab-on-chip‘ (LoC)-Technologie zu erhalten. Solche Systeme stellen mikrofluidische Plattformen dar, die alle Schritte einer nasschemischen Analyse, von der Probennahme, über die Probenbehandlung, chemischer Reaktion, Detektion und der Datenverarbeitung in nur einem einzigen Gerät ermöglichen. Hierbei stellt deren geringe physische Größe, Portabilität, sowie ihr geringer Strom- und Reagenzienverbrauch ein Schlüsselement für geplante autonome *In-situ*-Langzeitmessungen dar.

Im Folgenden die wichtigsten Ergebnisse dieser Studie:

- Die im Labor durchgeführte Charakterisierung der LoC-Analysatoren zeigte ein lineares Verhalten über einen weiten Konzentrationsbereich, von der unteren Nachweisgrenze (1.9 nM für DFe und 27.1 nM für DMn) bis zu mehreren  $\mu\text{M}$  des jeweiligen Spurenmetalls. Dieser Detektionsbereich ermöglicht Bestimmungen in ozeanischen Regionen, die erhöhte Spurenmetallkonzentrationen aufweisen. Hierzu zählen z.B. Regionen, die durch einen erhöhten Eintrag von Wüstenstaub charakterisiert sind oder Regionen in der Nähe von Spurenmetallquellen wie Küsten-, Fjord- und Flussmündungssystemen oder hydrothermalen Quellen in der Tiefsee. Für den Einsatz im offenen Ozean sind jedoch Nachweisgrenzen von bis zu 0.1 nM erforderlich. Daher müssen weitere Forschungsarbeiten durchgeführt werden, um Verteilungen von Spurenmetallen in ozeanischen Regionen, die durch Spurenmetallverarmung gekennzeichnet sind, *in situ* quantifizieren zu können.
- Es wurde festgestellt, dass das ursprüngliche Design des LoC-Analysators für die DFe-Bestimmung überarbeitet werden musste, um eine On-line-Ansäuerung der Wasserprobe zu ermöglichen. Dies war notwendig, da während einer Testkampagne in der Kieler Förde (Deutschland) mit der ersten Analysatorgeneration eine Unterbestimmung der *in situ* bestimmten DFe-Konzentrationen zwischen 16 % und 75 % verglichen zu diskreten Proben, analysiert mittels ICP-MS, beobachtet wurde. Laborbasierte Ansäuerungsexperimente mit einer natürlichen Wasserprobe zeigten, dass eine vollständige Wiederfindung der spektrophotometrisch bestimmten DFe-Konzentration erzielt werden kann, wenn die Wasserprobe vor der Zugabe des FZ-Reagenzes auf  $\text{pH} \sim 1$  angesäuert wird. Dies ermöglicht eine Freisetzung der gesamten in natürlichen organischen Komplexen gebundenen Fe-Ionen, die somit

für FZ zugänglich sind. Allerdings wurde während einer Testkampagne mit der zweiten Analysatorgeneration festgestellt, dass die Anwendung von Säure zum Herauslösen von Fe aus den verwendeten Materialien führte, was eine Kontaminierung der Wasserprobe zur Folge hatte.

- Die Zusammensetzung des PAN-Reagenzes zur DMn-Bestimmung wurde erfolgreich für den Einsatz in einem mikrofluidischen System für Langzeitmessungen angepasst. Die Stabilität des PAN-Reagenzes konnte durch Anpassung der verwendeten Tensid-Konzentration verbessert werden. Ein Fe-Maskierungsmittel aus der Gruppe der Siderophoren, welches jegliche Fe induzierte Störung mit der PAN-Methode unterdrücken sollte, zeigte eine begrenzte Lebensdauer und wies ebenfalls eine Affinität zu Mn-Ionen auf. Dies führte zur Entfernung von Mn-Ionen aus dem für PAN zugänglichen Pool und somit zu einer Unterbestimmung der DMn-Konzentration.
- Eine Testkampagne mit einem DMn LoC-Analysator wurde erfolgreich in der Kieler Förde durchgeführt. Die *in situ* bestimmten DMn-Konzentrationen waren in guter Übereinstimmung mit denen der mittels ICP-MS analysierten diskreten Proben. Genauigkeiten von mitunter > 99 % wurden erzielt.

Insgesamt zeigt die hier vorgestellte Arbeit, dass die spektrophotometrische DMn-Bestimmung auf einem mikrofluidischen Chip basierenden System ein leistungsfähiges Mittel für den Erwerb zuverlässiger und gut aufgelöster *In-situ*-DMn-Zeitreihen in Küstengewässern ist. Die *In-situ*-DFe-Quantifizierung bedarf weiterer Verbesserungen, stellt aber in ihrem derzeitigen Zustand eine nützliche Technik zur Erfassung relativer Änderungen der DFe-Konzentrationen im Meerwasser dar.

Die vorliegende Arbeit trägt zur dringend notwendigen Entwicklung autonomer *In-situ*-Beobachtungsplattformen für Spurenmetalle in Meeresgewässern bei. Der Einsatz solcher Systeme hilft, grundlegende biogeochemische Prozesse im Zusammenhang mit der Verteilung gelöster Spurenmetalle besser zu verstehen. Darüber hinaus können Daten zukünftig durchzuführender Messkampagnen verwendet werden, um Spurenmetallflüsse zu berechnen, Lücken in Datenbanken zu schließen und bieten somit die Grundlage zur Vorhersage über Folgen des Klimawandels.